

Au-conjugate 면역화학 진단용 금 나노입자 제조

박성태[†] · 이광민

전남대학교 신소재공학부 및 나노기술연구센터

Fabrication of Au Nanoparticle for Au-conjugate Immuno Chemistry Probe

Sung-Tae Park[†] and Kwang-Min Lee

Department of Materials Science Engineering and Nano Technology Research Center
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(2003년 6월 30일 받음, 2003년 8월 14일 최종수정본 받음)

Abstract Current nanogold cluster synthesized by chemical routine with 11 or 55 atoms of gold has been widely used for immuno chemistry probe as a form of nanocluster conjugated with biomolecules. It would be an undeveloped region that the 1 nm size of nanogold could be made by materials engineering processing. Therefore, objective of this study is to minimize the size of gold nanocluster as a function of operating temperature and chamber pressure in inert gas condensation (IGC) processing. Evaporation temperature was controlled by input current from 50 A to 65 A. Chamber pressure was controlled by argon gas with a range of 0.05 to 2 torr. The gold nanocluster by IGC was evaluated by X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM). The gold nanocluster for TEM analysis was directly sampled with special in-situ method during the processing. Atomic force microscopy (AFM) was used to observe 3-D nanogold layer surfaces on a slide glass for the following biomolecule conjugation step. The size of gold nanoclusters had a close relationship with the processing condition such as evaporation temperature and chamber pressure. The approximately 1 nm size of nanogold was obtained at the processing condition for 1 torr at 1124°C.

Key words nanogold, IGC, immuno chemistry probe

1. 서 론

수 nm에서 수십 nm까지의 크기를 갖는 나노분말 재료는 μm 크기의 분말재료에서 볼 수 없었던 흥미롭고 우수한 여러 가지 특성들을 가지고 있으며 응용분야도 많이 연구되고 있다. 그 중에 면역화학법은¹⁾ 새로운 기능을 갖는 antibody-gold cluster의 출현과 더불어 많은 방법적 개발이 요구되는 연구 분야이다. 즉 신경전달물질 (neurotransmitter)이나 이의 합성에 관련된 효소단백질 (enzyme), 신경조직의 각 세포에만 있는 표지단백질 (marker protein) 등 신경세포 내에서 중요한 작용을 하는 물질의 위치와 상태를 알기 위한 방법으로, 항원-항체 면역반응²⁾을 이용한다. 특정한 항원이 있는 신경조직 표본을 이 항원에 특이성을 갖는 항체가 함유된 용액으로 처리하면 항체는 항원과 결합하며, 항체가 현미경으로 관찰할 수 있게 표지되어 있으므로, 항원의 위치를 관찰할 수 있다. 이 방법이 개발되면 기존의 광학적 수준의 면역화학법은 전자현미경 수준으로 보편화될 것이며 현재는 산업적으로 세계에서 유일하게 개발되어 판매하고 있는 미국 NanogoldTM 사의 gold cluster³⁾가 있다.

Fig. 1은 실제로 NanogoldTM에서 시판하고 있는 금 나노입자의 모형으로 $\text{Au}_{11}(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3)_7$ 의 구조로 대략 55개의 금 원자로 구성되어 있으며 전체 크기는 2.7 nm 이다. 1.4 nm의 금 코어 입자의 특성으로는 화학적으로 안정하고 세포내 투과가 용이하며 표지화가 잘되고 응집이 잘 일어나지 않는 것으로 알려져 있다.³⁾ 특히 gold cluster는 antibody 이외에도 다양한 생분자에 주입되어 사용될 수 있음이 밝혀져 있어, 그 파급 효과는 지대하리라 생각된다.

나노입자를 제조하는 방법에는 스퍼터링법,⁴⁾ CVC법,⁵⁾ 졸겔법,⁶⁾ 화염법,⁷⁾ 레이저법⁸⁾ 등 여러 가지가 있다. 여러 가지 방법 중 IGC(Inert Gas Condensation)에 의한 증발-응축 방법은 발열부에 증발금속을 장치하고, 챔버내에 저압의 Ar, He 등의 불활성 가스의 분위기 중에서 발열체에서 증발된 원자 클러스터와 대류가스가 충돌한 후 열 이동에 의하여 원자의 집합, 합체된 나노입자를 응축시키는 원리이다. Yatsuya는⁹⁾ 알루미늄을 IGC법으로 헬륨 분위기에서 증발실험 하여 불활성가스, 증발온도, 반응시간의 증가에 따라 입자의 크기가 증가하는 결과를 관찰하였다. 이후 IGC법을 이용해 Bi, Cu, Pd 등의 나노입자 제조에 관한 연구가 활발히 진행되어 그 특성들이 많이 보고되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ IGC법으로 제조된 분말은 기존

[†]E-Mail : maggotbrain12@hotmail.com

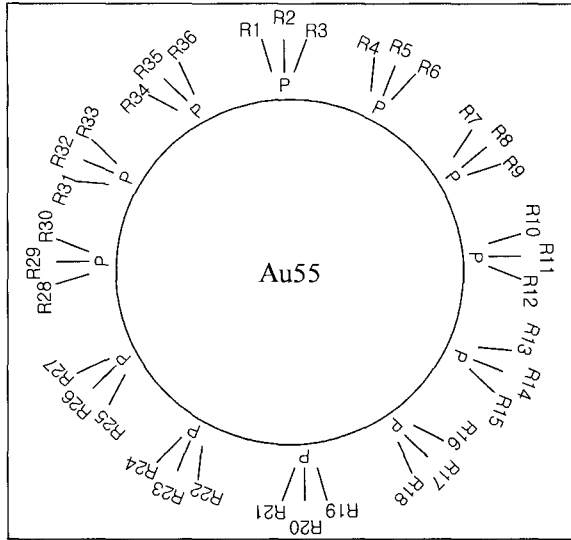


Fig. 1. Gold-55 cluster which is 1.4 nm in diameter with an organic shell of 12 derivatized triphenylphosphines with an overall dimension of 2.7 nm.

의 화학적 방법이나 기계적 합금법으로 제조된 분말에 비하여 크기가 미세하고 고순도의 나노입자를 얻을 수 있으며 제조된 입자는 균일한 나노입자 형성과 좁은 크기 분포를 갖는다. 입자의 크기는 시료의 증발온도, 대류가스의 종류와 챔버 압력으로 조절되며 보통 수 나노에서 수십 나노크기로 제어가 가능하다. 용해된 금속의 표면에서 증발된 금속원자는 액체 질소로 냉각된 냉각봉에 응집되어 원자의 집합체로서의 미립자가 생성된다. 본 연구에서는 면역화학법에 이용되는 nanogold 항체 probe용 금 나노분말을 제조하기 위한 시료로 wire(1φ, 10 mm) 형태를 사용하였고, 저항가열을 이용하여 W 발열체에서 증발시켰으며 IGC 증발-응축공정 변수 중 대류 가스 압력과 증발원의 온도를 달리 하였을 때의 생성된 금 나노입자의 결정구조 및 크기, 형상 등에 대하여 조사하였다.

2. 실험 방법

본 연구에서 금 나노분말을 제조하기 위하여 1φ, 10 mm의 금 와이어를 이용하였다. 챔버는 로터리 펌프와 확산 펌프를 이용하여 10⁻⁶ torr 고진공 처리한 후 고순도의 Ar 가스 분위기하에서 텅스텐 boat를 저항 가열하여 금 와이어를 증발시켰다. 금 와이어의 증발시 챔버내의 압력은 Ar gas를 가스 유량 조절기(Mass Flow Controller; MFC)를 이용하여 100~300 sccm을 유입시켜 0.05 torr~2 torr로 조절하였으며, 저항가열을 이용한 발열부의 증발온도는 인가전류량(50A~65A)을 달리하여 933°C~1500°C로 조절하였다. 발열부의 온도는 진공분위기에서 열전대로 측정된 평균값을 사용하였다.

금 와이어의 양은 0.5 g, 증발시간은 증발온도에 따라 20~60 sec 범위에서 조절하였다. 증발된 입자들은 액체 질소로 냉각된 냉각봉에 응착되며 챔버내의 냉각봉의 온

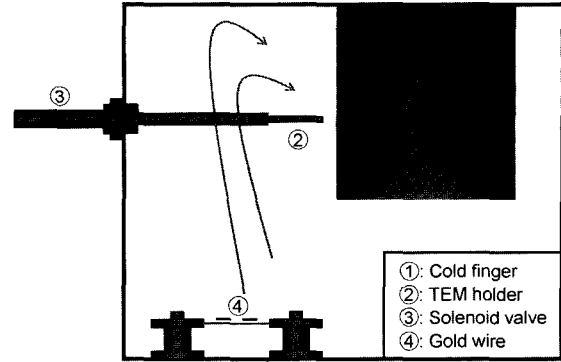


Fig. 2. Schematic diagram of IGC.

도가 상온과 같아지면 챔버를 열어 나노분말을 채취하였다. 채취한 나노분말 입자의 새로운 상 생성 등을 알아보기 위해 X-선 회절시험(Rigaku, DMAX/1200)을 하였다. 제조된 입자의 미세구조는 Cu-grid로 샘플링 하여 투과전자현미경(Field-Emission Transmission Electron Microscope : FE-TEM, Philips, Tacnai F20)으로 관찰하였다. 투과전자현미경 분석용 나노분말의 샘플링은 Fig. 2와 같은 in-situ 방법을 채택하였다. 즉 Cu-grid를 금 와이어가 증발중인 챔버내의 냉각봉 쪽으로 1-3 sec 노출시켜 공정중에 형성되는 나노입자를 직접 샘플링 하였다. 이는 기존에 제조된 분말을 수용액에 분산시킨 후 Cu-grid로 건져내고 다시 장시간 건조시켰던 방법보다 증발된 나노입자들의 형태를 그대로 관찰할 수 있는 장점이 있다. 냉각봉 위치에 따른 입도 분포의 차이를 배제하기 위하여 이 장치는 냉각봉 하단으로부터 10 cm 떨어진 곳에 설치하였다. 제조된 금 나노입자의 buffer layer 형성을 위해 황 성분을 포함하고 있는 mercaptoundecanoic을 각각의 금 입자와 결합시켜 소위 gold-mercaptoundecanoic 복합유기물을 제조하였으며 이 과정은 AFM(Atomic Force Microscope)을 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 3은 IGC 공정 중 냉각봉에 형성된 금 나노분말을 채취하여 X-선 회절시험한 결과를 나타낸 그림이다. Fig. 3(a)와 (b)에서 볼 수 있듯이 챔버압력 및 증발온도와 무관하게 냉각봉에 형성되는 나노입자들은 단일상의 금 입자가 생성되었다. 이와 같이 IGC법으로 나노입자를 제조하는 방법은 불순물의 영향을 거의 받지 않는다고 볼 수 있다.

Fig. 4는 증발온도 1124°C, 챔버압력 1 torr의 IGC 공정조건으로 제조된 금 나노입자를 Cu-grid로 샘플링하여 투과전자현미경으로 관찰한 결과로서 명시야상(bright-field image)과 제한시야회절(selected area diffraction : SAD) 패턴을 나타낸 결과들이다. Fig. 4(b)는 Fig. 4(a)의 점선 부분의 제한시야회절패턴이며 제한시야회절패턴은 (111), (200), (220), (311)면지수를 갖는 확산 링(diffused ring) 패턴을 나타내는 금 나노입자들이다. Fig. 4(c)는 Fig.

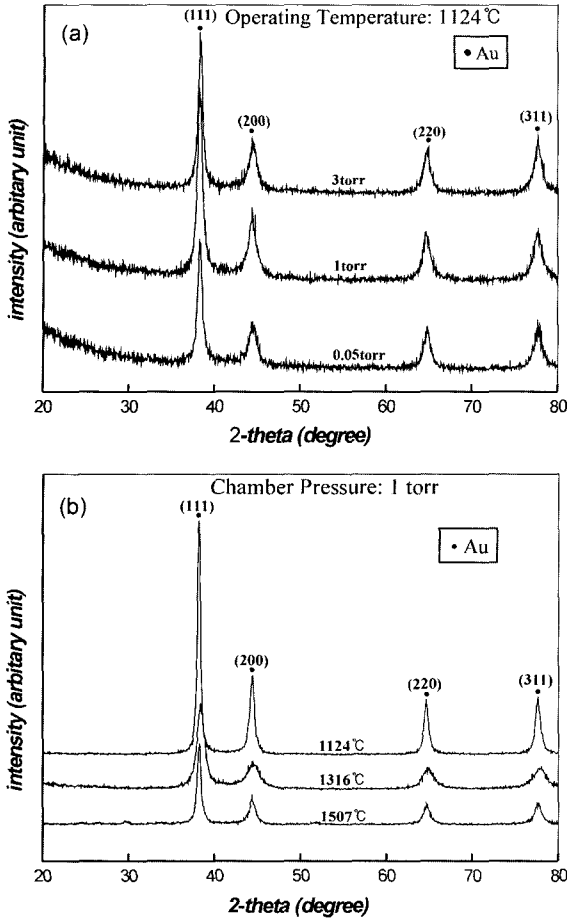


Fig. 3. X-ray diffraction patterns of Au nanoparticles as a function of (a) chamber pressure and (b) operating temperature.

4(a)의 점선 안에 하나의 결정의 고분해능상을 나타낸다. Fig. 4(a)에서 알 수 있듯이 생성된 나노입자들은 구형의 5 nm 크기의 비교적 균일한 입자가 생성됨을 확인할 수 있었고 Fig. 4(c)의 격자선 분석결과 (111)면의 1.1659 Å의 격자상수를 갖는 단결정의 금 나노입자를 확인할 수 있었다. 한편 본 연구에서 IGC 공정 조건에 따라 형성

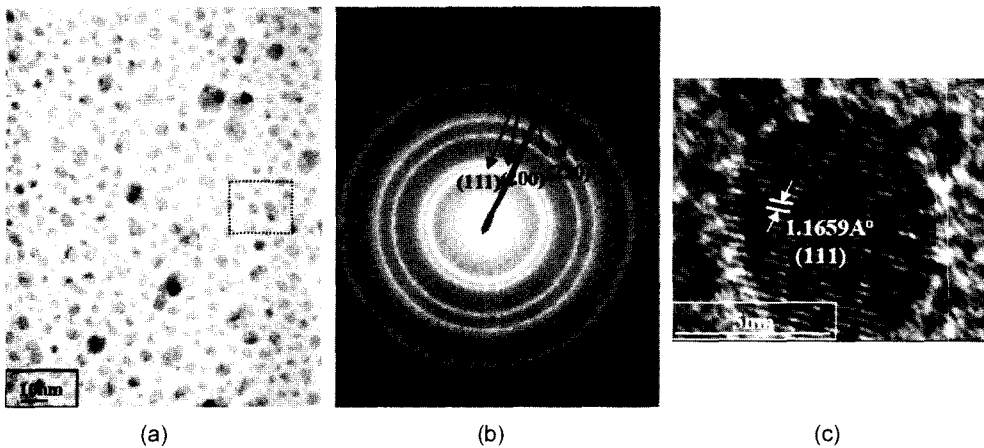


Fig. 4. Transmission electron micrographs of gold nanoparticles processed with IGC: (a) bright field image, (b) SAD pattern, (c) lattice fringe on the plane of (111).

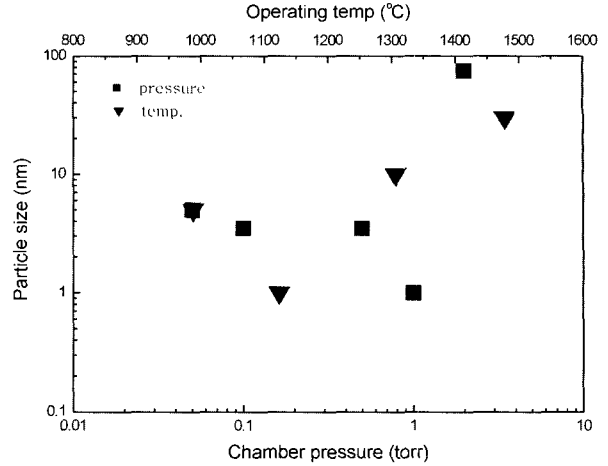


Fig. 5. Effect of operating temperature and chamber pressure on the size of gold nanoparticles.

되는 금 나노입자는 단결정 또는 3~5개의 결정이 모여진 다결정의 구조를 나타냄을 투과전자현미경으로 확인하였다.

Fig. 5는 증발온도와 챔버압력에 따라 냉각부에 형성된 금 나노입자의 크기를 나타낸 그래프이다. 1 torr의 챔버압력에서 증발온도를 달리하였을 경우, 993°C와 1124°C에서는 1-5 nm의 금 나노입자가 형성되었고 1316°C에서는 10 nm의 금 나노입자가 형성되었다. 1500°C 이상의 증발온도에서는 입자의 크기가 30 nm 이상으로 조대해지며 불균일한 입자들이 형성되었다. 이는 증발온도의 감소와 냉각속도의 증가시 입자의 크기는 감소하며¹³⁾ 낮은 증기압에서 증발온도가 낮아지면 입자의 크기도 작아지는 Yatsuya의 실험⁹⁾과 일치하였다. 실험 목적에 가장 적합한 구형의 균일한 입자의 형성은 증발온도가 1124°C이었기 때문에 이 온도에서 챔버압력을 달리하여 냉각부에 형성되는 입자의 크기를 분석하였다. 챔버압력이 0.05 torr 일 때에는 5 nm, 0.5 torr와 0.1 torr에서는 2~5 nm의 나노입자가 형성되었다. 챔버압력이 1 torr에서 1 nm 크기의 균일한 구형의 입자가 형성되었으며 압력이 2 torr

이상에서는 75 nm의 조대한 나노입자가 형성되었다. 면역화학진단용으로 사용되는 금 나노입자의 크기는 1 nm가 가장 적합하기 때문에 이 조건에서의 재현성을 알아보기 위하여 1124°C, 1 torr의 공정조건으로 수차례 실험한 결과 비슷한 결과 값을 얻을 수 있었다.

Fig. 6은 챔버압력이 1 torr이고 증발온도를 달리 하였을 때의 금 나노입자를 고분해능 투과전자현미경으로 관찰한 결과이다. 냉각봉에 형성되는 나노입자는 증발온도의 영향을 받으며 그림과 같이 증발온도의 조건에 따라 입자의 크기는 변화하였다. Fig. 6(a)는 증발온도가 993°C 일 때의 금 나노입자의 형상으로 구형이며 5 nm의 크기의 균일한 형태를 갖는다. (c)는 1316°C 일 때의 금 나노입자의 형상으로 (a)의 조건일 때보다 입자의 크기가 10 nm로 증가한 것을 볼 수 있다. (d)는 1507°C의 조건이며 (c)의 조건 일 때보다도 입자의 크기가 30 nm이상으로 증가한 것을 알 수 있었으며 1124°C 조건에서는 1 nm 크기를 형성하였다. 그림에서 알 수 있듯이 증발온도와 증발속도와는 밀접한 관계가 있으며 Barnes¹⁴⁾ 등은 이를 증발시 이온화 에너지의 크기로 설명하고 있다. 그러나 증발온도가 낮은 조건일 때의 입자크기 변화에 대한 본 연구 결과는 불규칙한 양상을 보인 바, 이에 대한 후속 연구가 더 필요하리라 생각된다.

Fig. 7은 증발온도가 1124°C이고 챔버의 압력을 달리 하였을 때의 금 나노입자의 형태를 고분해능 투과전자현미경으로 관찰한 결과이다. 그림 (a)는 챔버 압력이 0.05 torr, (b)는 0.1 torr, (c)는 0.5 torr, (d)는 1 torr, (e)는

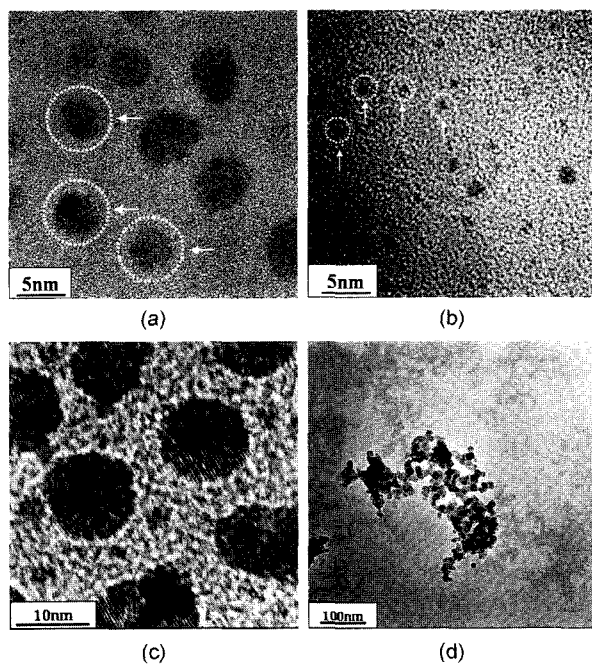


Fig. 6. Transmission electron micrographs of Au nanoparticles with 1 torr as a function of operating temperature: (a) 993°C, (b) 1124°C, (c) 1316°C and (d) 1507°C.

2 torr 일 때의 금 나노입자의 형상이다. 전체적으로 구형의 균일한 입자가 형성되는 것을 확인할 수 있었고 증발온도 보다는 챔버압력이 입자 크기변화에 보다 큰 영향을 미쳤다. 챔버압력 증가에 따른 입자크기 분포를 나

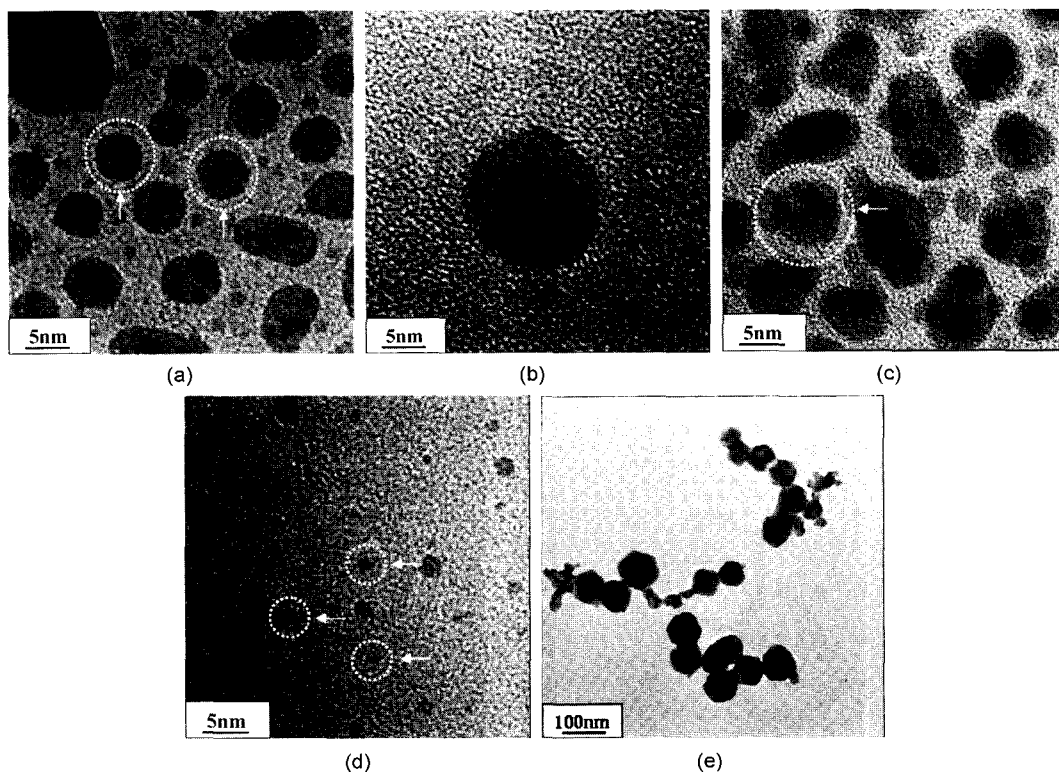


Fig. 7. Transmission electron micrographs of Au nanoparticles at 1124°C as a function of chamber pressure: (a) 0.05 torr, (b) 0.1 torr, (c) 0.5 torr, (d) 1 torr and (e) 2 torr.

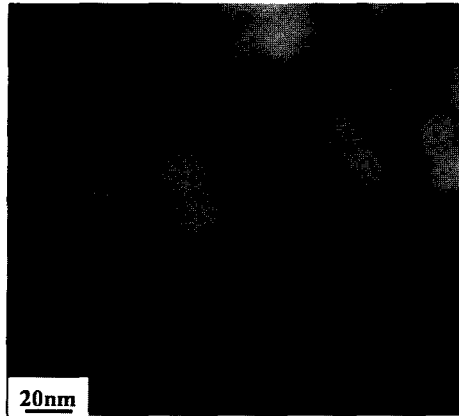


Fig. 8. AFM topograph of Au nanoparticles coated by mercaptoundecanoic acid.

타넨 Feng의 나노입자 연구¹⁵⁾에서도 압력증가가 나노입자 크기를 결정짓는 중요한 변수이었다. 그림(d)에서와 같이 2 torr 이상의 조건에서 금 입자가 갑자기 조대해지고 불규칙한 형태를 갖는 이유는 챔버 내에 정상상태의 대류기류가 생성되지 않고 기류의 모양이 시간에 따라 변화하며 다양한 형태의 난류가 발생하기 때문으로 생각되어진다. 가스응축 공정에 있어 원자 클러스터의 형성을 제어하는 것으로는 응축이 일어나는 과포화 영역으로의 원자의 공급 속도, 가스응축 매체에 의해 증발원자의 에너지 상실속도, 과포화 영역에서 생성된 클러스터의 제거 속도의 3가지로써 이들이 나노입자 형성에 미치는 주요한 속도인자가 된다.¹⁶⁾ 결국 이는 증발원의 온도와 압력 차이가 원자 클러스터의 중요한 제어 인자가 될 수 있다는 점이다. 실제로 챔버 내부의 압력을 일정하게 하고 증발온도를 변화 주었을 때 온도가 높아지면서 내부 밀도가 낮아지기 때문에 대류유동의 크기가 낮게 나타나며 증발된 금 나노입자는 대류가스와 같은 대류 유동을 보이므로 낮은 밀도에서는 금 원자들의 빈번한 충돌로 보다 큰 클러스터를 형성하게 된다. 또한 증발 온도를 일정하게 하고 챔버 내부의 압력을 변화시켰을 경우는 챔버압력이 높아질 때 챔버내부밀도 또한 높아지기 때문에 입자의 크기는 작아지게 된다. 이 과정들은 매우 짧은 시간 안에 일어나며 Hihara¹⁷⁾에 의하면 과포화 영역에서 원자가 불활성 가스와 충돌하는데 걸리는 시간은 50~500 ns 라고 보고한 바 있다.

Fig. 8은 증발온도 1124°C, 챔버압력 1 torr의 IGC 공정조건으로 제조된 금 나노입자를 석영판 위에 증착시킨 후, 0.05 g의 mercaptoundecanoic산을 20 ml의 증류수에 섞어 초음파로 한 시간 분산시킨 수용액을 석영판 위에 떨어뜨리고 진공 오븐에서 5시간 증발시킨 시편을 AFM으로 분석한 그림이다. 금 나노입자의 코팅막은 석영판 위에 5~7 nm 크기로 형성되었으며, mercaptoundecanoic산으로 코팅된 막은 15~20 nm의 크기를 나타내었다. 또

한 금 입자들이 다른 입자들과 결합하지 않고 분리되어 있는 형상도 함께 관찰 할 수 있었다.

4. 결 론

1. IGC법으로 제조된 금 나노입자는 증발온도와 챔버압력의 공정 조건에 따라 1~75 nm 크기를 나타내었다.
2. 투과전자현미경 분석결과 증발온도가 1124°C이고 챔버압력이 1 torr 일때 균일한 1 nm 크기의 금 나노입자가 형성되었다.
3. mercaptoundecanoic산으로 코팅된 금 나노입자는 15~20 nm 크기의 각각 분리된 입자의 코팅층을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2002-000-00119-0) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. H. Sawada and M. Esaki, *J. Histochem Cytochem.*, **48**, 493 (2000).
2. A. Kohler, B. Lauritzen and C. J. F. Van Noorden, *J. Histochem Cytochem.*, **48**, 993 (2000).
3. How does Gold Cluster Labeling Work, <http://www.nanoprobe.com> (2003).
4. A. C. Xenoulis, G. doukellis and T. Tsakalakos, *Nanostruct. Mater.*, **10**, 1347 (1998).
5. J. H. Yu, J. S. Lee and K. H. Ahn, *Scripta Mater.*, **44**, 2213 (2001).
6. S. H. Hyun and B. S. Kang, *J. Am. Ceram. Soc.*, **12**, 3093 (1994).
7. S. Miyaka, N. Kinomura, T. Suzuki and T. Suwa, *J. Mater. Sci.*, **12**, 2921 (1999).
8. M. I. Baraton and L. Merhari, *Mater. Trans.*, **42**, 1616 (2001).
9. S. Yatsuya, S. Kasukabe and R. Uyeda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **12**, 1675 (1973).
10. K. Sattler, J. Muhlbach and E. Recknagel, *Phys. Rev. Lett.*, **45**, 821 (1980).
11. R. W. Siegel, *Ann. Rev. Mater. Sci.*, **21**, 559 (1991).
12. H. Konard, T. Haubold, R. Birringer and H. Gleiter, *Nanostruct. Mater.*, **7**, 605 (1996).
13. K. Wenger, B. Walker, S. Tsantilis and S. E. Pratsinis, *Chem. Engin. Sci.*, **57**, 1753 (2002).
14. M. C. Barnes, I. D. Jeon, D. Y. Kim and N. M. Hwang, *J. Cryst. Growth*, **242**, 455 (2002).
15. Feng Ye, M. C. Yang, X. K. Sun and W. D. Wei, *Nanostruct. Mater.*, **9**, 113 (1997).
16. R. W. Siegal, *Materials Science and Technology*, p. 583, vol. 15, VCH, Weinheim, (1991).
17. T. Hihara, D. Peng and K. Sumiyama, *Mater. Trans.*, **42**, 1480 (2001).